昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, December 2016, 59(12): 1325－1331 doi:10.16380/j.kcxb.2016.12.005

黑腹果蝇保幼激素反应区(JHRR)与核蛋白结合能力调控的分子机制

何倩毓[1,*]，张原熙[2]

（1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院，黑龙江大庆 163319；2. 大庆市环保局环境监测中心站，黑龙江大庆 163316）

摘要：【目的】保幼激素反应区(juvenile hormone response region, JHRR)是在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster Krüppel homolog* 1 (*Kr-h*1)启动子转录调控区中鉴定获得的长 120 bp 的核苷酸序列。本研究旨在检测果蝇 JHRR 中 3 个类 E-box 序列(2 个 B box 和 1 个 C box)对 JHRR 核蛋白结合能力的影响，以及保幼激素(juvenile hormone, JH)、JH 受体 Met(Methoprene-tolerant)和热激蛋白 Hsp83 对 JHRR 核蛋白结合能力的调控。【方法】利用凝胶迁移阻滞(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)技术分析果蝇 JHRR 中 2 个 B box 或 1 个 C box 突变后 JHRR 与 Kc 细胞中核蛋白的结合情况；提取游走早期 JH 滴度较高时期 JH 缺失果蝇(*Aug*21-*GAL4* > *UAS-Grim*)、*Met/Gce* 双缺失果蝇(Met^{27} $gce^{2.5k}$)、*Met* 超表达果蝇(*Lsp*2-*GAL4* > *UAS-Met-V*5)以及 *Hsp*83 纯合突变果蝇($Hsp83^{08445}$)脂肪体组织中的核蛋白，利用 EMSA 技术分析它们对 JHRR 核蛋白结合能力的调控情况。【结果】EMSA 检测结果表明，B box 或 C box 突变后均可降低 JH 促进的 JHRR 与 Kc 细胞中核蛋白的结合，且 C box 的效果更强；JH 缺失果蝇、*Met/Gce* 双缺失果蝇脂肪体组织中核蛋白与 JHRR 的结合几乎检测不到，而在 *Hsp*83 纯合突变果蝇脂肪体组织中核蛋白与 JHRR 的结合显著下降。相反，JHRR 与核蛋白的结合在 *Met* 超表达果蝇中显著增强。【结论】B box 和 C box 对 JHRR 与核蛋白结合是必需的，且 JHRR 与核蛋白的结合依赖于 JH 和 Met，并且受 Hsp83 的调控。

关键词：黑腹果蝇；保幼激素；Met；JHRR；Hsp83；核蛋白结合

中图分类号：Q966 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2016)12-1325-07

Molecular mechanisms regulating the binding capacity of juvenile hormone response region (JHRR) to nuclear proteins in *Drosophila melanogaster*

HE Qian-Yu[1,*], ZHANG Yuan-Xi[2] (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Helongjiang 163319, China; 2. Environmental Monitoring Center Station, Daqing Environmental Protection Agency, Daqing, Helongjiang 163316, China)

Abstract:【Aim】Juvenile hormone response region (JHRR) is a 120 bp nucleotide sequence identified from the promoter regulatory region of *Krüppel homolog*1 (*Kr-h*1) in *Drosophila*. This study aims to detect the effects of three E-box like motifs (two B boxes and one C box) on the binding capacity of JHRR to nuclear proteins, and to illustrate the regulatory effects of JH, JH receptor－Methoprene-tolerant (Met) and heat shock protein Hsp83 on the binding capacity of JHRR to nuclear proteins.【Methods】The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was used to analyze the binding capacity of JHRR with two B boxes or one C box mutants to nuclear proteins in Kc cells. Nuclear proteins of fat body tissues, which were isolated from JH deficient flies (*Aug*21-*GAL4* > *UAS-Grim*), *Met/Gce* double mutant flies (Met^{27} $gce^{2.5k}$),

基金项目：国家自然科学基金项目(31501899)；黑龙江省自然科学基金项目(C2016040)；黑龙江八一农垦大学学成、引进人才科研启动项目(XYB2015-07)

作者简介：何倩毓，女，1986 年 10 月生，江西抚州人，博士，讲师，研究方向为昆虫变态发育的激素调控，E-mail：heqianyu2005@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：heqianyu2005@163.com

收稿日期 Received：2016-09-26；接受日期 Accepted：2016-11-09

Met overexpressed flies (*Lsp2-GAL4* > *UAS-Met-V5*) and *Hsp83* homozygous mutant flies ($Hsp83^{08445}$) at the early wandering stage when the JH titer was high, were extracted, and the binding capacity of JHRR to nuclear proteins was detected by EMSA. 【Results】EMSA results showed that both B box and C box mutation decreased the JH-induced binding capacity of JHRR to nuclear proteins in Kc cells, and the inhibitory effect of C box mutation was even more efficient. The binding complex of JHRR and nuclear proteins which were extracted from fat body tissues of JH deficient or *Met/Gce* double mutant larvae at the wandering stage was almost undetectable, and decreased significantly when the nuclear proteins were extracted from *Hsp83* homozygous mutant larvae. In contrast, the formation of JHRR-nuclear protein complex was enhanced significantly when the nuclear proteins were extracted from fat body tissues of *Met* overexpressed larvae. 【Conclusion】B box and C box are essential for JHRR to bind to nuclear proteins, and the binding activity of JHRR to nuclear proteins is dependent on JH and Met and regulated by Hsp83.

Key words: *Drosophila melanogaster*; juvenile hormone; Met; JHRR; Hsp83; nuclear protein binding

保幼激素(juvenile hormone, JH)是由昆虫咽侧体合成分泌的倍半萜类化合物,它是昆虫变态发育过程中一类重要的调控激素。其主要功能包括维持昆虫幼虫和蛹的形态,促进卵巢成熟,调控昆虫的发育、变态、信息素的产生以及交配等生理活动(Bernardo and Dubrovsky, 2012; Bilen *et al*., 2013; Jindra *et al*., 2013, 2015)。大量研究证明 JH 以上功能的实现主要是通过其受体 Methoprene-tolerant (Met)来执行的。Met 属于 bHLH-PAS 转录因子家族成员(Ashok *et al*., 1998),最早是在筛选耐受 JH 类似物 Methoprene 的果蝇突变体中被发现,故被命名为 Methoprene-tolerant (Wilson and Fabian, 1986)。但是 *Met* 无义突变果蝇可以正常存活,并未表现出明显的发育缺陷(Ashok *et al*., 1998)。而当 *Met* 及其同源类似基因 *gce*(*germ cell-expressed*)同时缺失时,该果蝇表现出类似 JH 缺失果蝇的表型。并且 Met 和 Gce 被证明在 JH 信号通路中功能冗余(Abdou *et al*., 2011)。同样,在仅含有 1 个 *Met* 基因的昆虫如赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中,*Met* RNAi 可导致昆虫提前变态,表型也类似于 JH 信号被阻断(Konopova and Jindra, 2007)。序列比对及进化分析表明果蝇 *Met* 是在高等昆虫进化过程中由 *gce* 通过基因复制产生的(Baumann *et al*., 2010)。相对于 *Met*,果蝇 *Gce* 与其他昆虫中 *Met* 的同源性更高(Baumann *et al*., 2010)。除上述表型研究表明 Met 可能是 JH 的受体外,结合实验证明 Met 或 Gce 与生理浓度的 JH 具有高结合能力,*K*d 值约为 5.3 nmol/L (Miura *et al*., 2005; Charles *et al*., 2011),并且 JH 的结合位点位于 PAS B 结构域中(Charles *et al*., 2011; Jindra *et al*., 2015)。当 Met 处于 JH 结合状态时,Met 可与 bHLH-PAS 转录因子家族的其他成员结合,如 Taiman/类固醇激素受体共激活物(steroid receptor coactivator, SRC)/与 βFtz-F1 结合的类固醇激素受体共激活物(βFtz-F1 interacting steroid receptor coactivator, FISC)或 Cyclin 等,从而激活 JH 诱导的靶基因的转录进而介导 JH 信号传递(Li *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2011; Shin *et al*., 2012; Saha *et al*., 2016)。这一过程主要是通过 Met 及其共激活因子结合于 JH 调控的靶基因启动子区域的 JH 反应元件(JH response element, JHRE)而实现的。

最早被报道的 JHRE 是 Li 等(2011)在埃及伊蚊 *Aedes aegypi* 的 *early trypsin* (*ET*)基因启动子区域中鉴定出来的。随后陆续在家蚕 *Bombyx mori*、赤拟谷盗 *T. castaneum* 以及黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 JH 初级反应基因 *Krüppel homolog*1 (*Kr-h*1)的转录调控区域中发现相似的 JHRE 序列(Kayukawa *et al*., 2012, 2013; Zou *et al*., 2013; He *et al*., 2014)。这些 JHRE 均含有可被 bHLH-PAS 转录因子结合的 E box(CACGTG)或类 E box 序列(如 B box: CATGTG; C box: CACGCG)(Dang *et al*., 1992)。在埃及伊蚊中,EMSA 实验结果表明 Met 及其共激活因子可结合在 JHRE 上(Li *et al*., 2011; Zou *et al*., 2013)。值得注意的是,我们在黑腹果蝇 *Kr-h*1 启动子上游鉴定得到的 JHRE 包含 2 个 B box 和 1 个 C box 序列。双荧光素酶报告检测结果表明,由当位于 JHRE 中的 B box 或 C box 突变后,JH 促进的由 JHRE 驱动的荧光素酶的活性显著降低或完全丧失;并且仅由 2 个 B box 或 1 个 C box 组成的荧光素酶报告载体对 JH 也是无应答的(He *et al*., 2014)。该现象表明 B box 和 C box 对 JH 调控果蝇

*Kr-h*1 基因的转录表达都是必需的。鉴于不同于其他实验室所得到的 JHRE,我们将这段含有 2 个 B box 和 1 个 C box 的长 120 bp 的调控区域命名为 JHRR(JH response region)(He *et al*., 2014)。

虽然有关 Met 及其共激活因子等核蛋白与 JHRE 的结合在埃及伊蚊中已有不少研究,然而果蝇 JHRR 与核蛋白的结合却少有报道。本实验以 Kc 细胞以及相关基因的突变或超表达果蝇为试验材料,从体外和体内两方面来研究 JHRR 的核蛋白结合活性的调控,以期深入研究果蝇 JH 调控靶基因转录表达的分子机制。

1　材料与方法

1.1　材料

本实验所用果蝇 Kc 细胞、转基因果蝇品系 *Met*^{27} *gce*$^{2.5k}$, *Aug*21-*GAL4*, *Lsp*2-*GAL4*, *UAS-Grim*, *UAS-Met-V*5 和 *Hsp*83^{08445} 均来自中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所李胜研究员实验室。

细胞培养使用添加 5% 胎牛血清(fetal bovine serum, South American Origin, Hyclone)的 Schneider 果蝇细胞培养基(Schneider's *Drosophila* medium 1×, liquid, Gibco, Invitrogen),在 27℃生化培养箱中培养。当细胞密度达到 1×10^6/mL 时,以 1∶5(v/v)的比例转移到新鲜培养基。

果蝇培养基为标准的玉米红糖培养基(玉米粉 80 g,红糖 125 g,酵母 16 g,琼脂 5 g 加水至 1 L)。所有果蝇培养于 25℃,相对湿度 70%,光周期 12L∶12D 的人工气候箱。

1.2　核蛋白提取

取经 Methoprene(终浓度为 1 μmol/L)(DMSO 为对照)或格尔德霉素(geldanamycin, GA)(终浓度为 1 μg/mL)(DMSO 为对照)处理的 Kc 细胞和处于游走早期 JH 滴度较高时期的各果蝇品系的脂肪体,然后利用细胞质与细胞核提取试剂盒(NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo))提取核蛋白,测定蛋白浓度后 −70℃保存备用。

1.3　凝胶迁移阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

1.3.1　生物素标记探针的制备:根据前期鉴定获得的长 120 bp 的 JHRR 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计正反向 PCR 引物,并由 Invitrogen 公司合成 5′端含有 Biotin 修饰的正反向引物,利用该引物进行 PCR 扩增并纯化,获得 Biotin 标记的野生型 JHRR,记为 WT。引物序列如下:S:TGATGAAGCGCATGCATGATTTC;AS:TGGCAGAGTTCGCGTGGCG。利用 overlapping PCR 扩增的方法分别获得 2 个 B box,1 个 C box 突变的 JHRR 探针,分别记为 2B* 和 C*。

1.3.2　EMSA 实验:利用 LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo)进行 EMSA 试验,具体实验操作如下:取 1.2 节提取的核蛋白 20 μg 与 2 μL 10× binding buffer、1 μL Poly (dI-dC)(1 μg/μL)及 ddH_2O 补至 20 μL 后混匀室温孵育 20 min(根据实验需要可加入 200 倍的未被 Biotin 标记的冷探针或抗体一并孵育);加入 0.5 μL Biotin 标记的探针混匀后室温孵育 10 min;然后将上述样品与上样缓冲液混合后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳条件为恒流 100 V,90 min;电泳结束前 20 min,用 0.5×TBE 缓冲液浸泡与胶大小相当的尼龙膜后进行转膜,转膜条件为恒流 380 mA,40 min;转膜结束后,取出尼龙膜垫于干净的滤纸上,于紫外灯下 10 cm 处进行 UV 交联,交联时间约为 10 min;随后进行辣根过氧化物酶标记的亲和素孵育、漂洗及显影等步骤。

2　结果

2.1　B box 及 C box 突变影响 JHRR 与核蛋白的结合

我们前期研究发现 Methoprene 可促进 JHRR 驱动的萤火虫荧光素酶的表达,而 B box 或 C box 突变后可导致 JHRR 驱动的萤火虫荧光素酶的表达显著降低或完全缺失(He *et al*., 2014),暗示 B box 和 C box 影响 JHRR 与转录调控因子的结合。利用 Methoprene (DMSO 为对照)处理 Kc 细胞 10 min,提取核蛋白进行 EMSA 试验。结果表明,Methoprene 可增强核蛋白与 WT JHRR 的结合(图 1: A, 第 3 泳道);而 2 个 B box 突变后, Methoprene 处理组中 JHRR 与核蛋白的结合有微弱的降低(图 1: A, 第 6 泳道),但是当 C box 突变后,JHRR 与核蛋白的结合几乎检测不到(图 1: A, 第 9 泳道)。竞争试验发现,未标记的 WT JHRR 探针可成功竞争核蛋白与标记的 WT JHRR 的结合(图 1: B, 第 3 泳道);而 2 个 B box 或 1 个 C box 突变的冷探针竞争能力显著下降,其中 C box 突变后的竞争能力最弱(图 1: B, 第 4 和 5 泳道)。该结果与前期双荧光素酶报告检测系统的结果相吻合,表明 B box 和 C box 确实对 JHRR 的核蛋白结合能力至关重要,二者缺一不可。

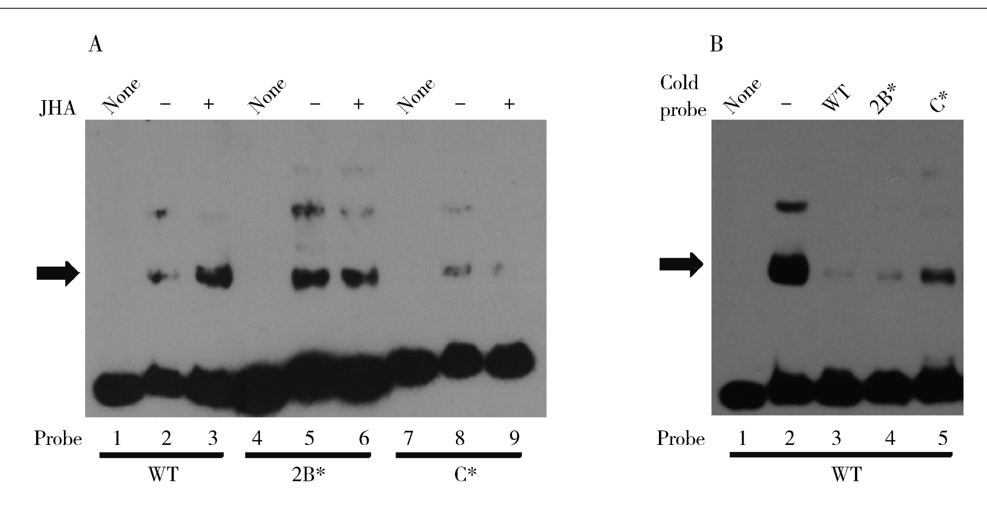


图 1 EMSA 分析 B box 和 C box 突变影响 JHRR 与果蝇 Kc 细胞核蛋白结合能力

Fig. 1 EMSA analysis of B box and C box mutation in JHRR affecting its binding capacity to nuclear proteins isolated from *Drosophila* Kc cells

A：野生型 JHRR 以及 2 个 B box 或 1 个 C box 突变后的 JHRR 与核蛋白结合能力的检测 Detection of the nuclear protein binding capacity of wild type JHRR and JHRR with two B boxes mutant or one C box mutant；B：2 个 B box 或 1 个 C box 突变后的 JHRR 与野生型 JHRR 竞争结合核蛋白能力的检测 Detection of the competitive binding capacity to nuclear proteins between JHRR with two B boxes mutant or one C box mutant and wild type JHRR. WT：野生型 JHRR Wildtype JHRR；2B*：2 个 B box 突变了的 JHRR JHRR with two B boxes mutant；C*：C box 突变了的 JHRR JHRR with C box mutant；JHA：Methoprene；+：Methoprene 处理的果蝇 Kc 细胞核蛋白 Nuclear proteins from Methoprene treated *Drosophila* Kc cells；-：DMSO 处理的果蝇 Kc 细胞核蛋白 Nuclear proteins from DMSO treated *Drosophila* Kc cells；None：未加任何蛋白 No protein was added. 箭头所示处为 JHRR 特异性结合条带。Arrowhead points to the specific JHRR bound band.

2.2 JH 缺失、*Met* 突变及超表达果蝇中 JHRR 的核蛋白结合能力检测

为了证明 JHRR 与核蛋白的结合依赖于 JH 和 Met，利用 JH 缺失果蝇 *Aug*21-*GAL4* > *UAS-Grim*，*Met* 及其同源基因 *Gce* 双缺失果蝇 $Met^{27}Gce^{2.5k}$ 以及脂肪体中 Met 超表达果蝇 *Lsp*2-*GAL4* > *UAS-Met-V*5 进行研究。提取处于游走早期 JH 滴度较高时期的上述果蝇脂肪体组织的核蛋白进行 EMSA 试验。结果显示，来源于 *Met*/*Gce* 双缺失果蝇以及 JH 缺失果蝇脂肪体组织中的核蛋白与 JHRR 的结合几乎检测不到（图 2：A），而来源于 *Met* 超表达果蝇脂肪体组织的核蛋白与 JHRR 的结合显著增强（图 2：B，第 4 泳道）。为了证实该结合能力的增强主要是由于 Met 超表达导致的，在核蛋白与 JHRR 孵育过程中加入 V5 标签抗体，结果显示 V5 抗体的加入可导致该增强条带的消失（图 2：B，第 8 泳道），而对来源于野生型果蝇组织中的核蛋白结合无影响（图 2：C，第 3 泳道），证明该特异性条带中与 JHRR 结合的核蛋白主要是 Met。以上结果表明，JHRR 与核蛋白的结合依赖于 JH 和 Met。

2.3 热激蛋白 Hsp83 调控 JHRR 与核蛋白的结合

我们前期研究发现，热激蛋白 Hsp83（脊椎动物 Hsp90 同源类似蛋白）通过调控 Met 亚细胞定位而参与 JH 信号传递。Hsp83 通过与 Met 的 bHLH 以及 PAS B 结构域结合后促使 Met 的构象成熟及稳定，从而有利于 Met 与 JH 的结合。一旦结合上 JH，Met 便从细胞质转移到细胞核内，最终在其他共激活因子的共同作用下促进 JH 下游靶基因 *Kr-h*1 的转录表达。而当加入 Hsp83 抑制剂格尔德霉素（geldanamycin，GA）或在 Hsp83 突变果蝇脂肪体中，Met 的入核受阻，同时 *Kr-h*1 的转录表达显著降低（He *et al*.，2014）。为了检测 Hsp83 是否影响 Met 在内的核蛋白与 JHRR 的结合，我们首先在细胞水平上利用 GA 与 Methoprene 对 Kc 细胞进行不同组合的处理，并提取核蛋白进行 EMSA 实验。与图 1（A）结果一致，Methoprene 处理可增强 JHRR 与核蛋白的结合（图 3，第 6 泳道）；但无论是 DMSO 处理组还是 Methoprene 处理组，GA 均可降低 JHRR 与核蛋白的结合（图 3，第 4 和 8 泳道）。其次利用 *Hsp*83 纯合突变果蝇 $Hsp83^{08445}$ 脂肪体组织中的核蛋白进行 EMSA 实验，结果也显示 JHRR 的核蛋白结合能力显著降低（图 2：B，第 6 泳道）。以上结果表明 Hsp83 可调控 Met 在内的核蛋白与 JHRR 的结合。

3 讨论

JH 作为昆虫变态发育过程中重要的调控激素，其分子作用机制随着受体 Met 及靶基因调控区域中

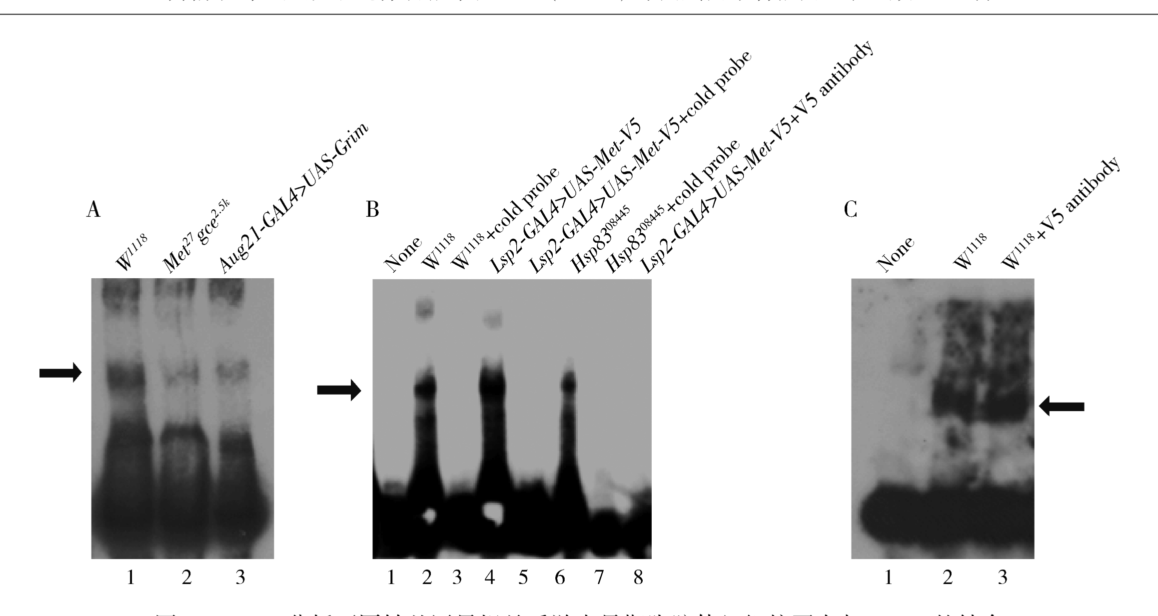


图 2　EMSA 分析不同转基因果蝇品系游走早期脂肪体组织核蛋白与 JHRR 的结合

Fig. 2　EMSA analysis of the binding capacity of JHRR to nuclear proteins of the fat body tissues isolated from different transgenic *Drosophila* lines during the early wandering stage

A：游走早期野生型果蝇、*Met/Gce* 双突变果蝇以及 JH 缺失果蝇脂肪体组织核蛋白与 JHRR 结合能力的检测 Detection of the binding capacity of JHRR to nuclear proteins extracted from the fat body tissues of wildtype flies, *Met/Gce* double mutant flies or JH deficient flies during the early wandering stage；B：游走早期野生型果蝇、Met 超表达果蝇以及 Hsp83 纯合突变果蝇脂肪体组织核蛋白与 JHRR 结合能力的检测 Detection of the binding capacity of JHRR to nuclear proteins extracted from the fat body tissues of wildtype flies, Met overexpressed flies or Hsp83 homozygous mutant flies during the early wandering stage；C：V5 抗体不影响野生型果蝇脂肪体组织核蛋白与 JHRR 的结合 Binding capacity of JHRR to nuclear proteins extracted from the fat body tissues of wildtype flies is unaffected by V5 antibody. 探针为生物素标记的野生型 JHRR，W^{1118} 为野生型果蝇。The Biotin labeled wildtype JHRR was used as the probe, and W^{1118} was the wildtype flies. None：未加任何蛋白 No protein was added.

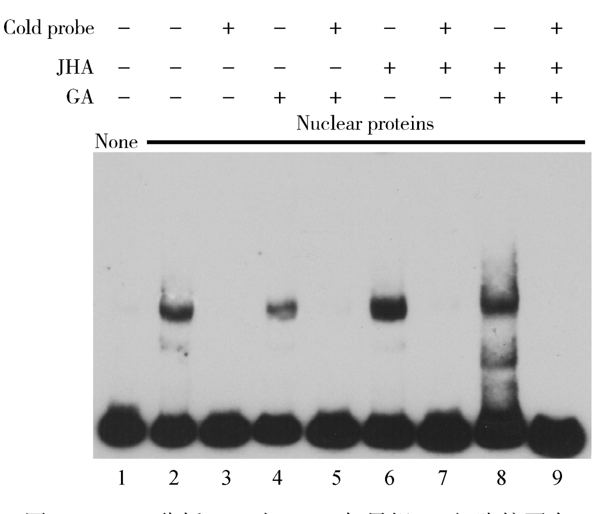


图 3　EMSA 分析 GA 对 JHRR 与果蝇 Kc 细胞核蛋白结合能力的影响

Fig. 3　EMSA analysis of GA treatment affecting the binding capacity of JHRR to nuclear proteins isolated from *Drosophila* Kc cells

JHA：Methoprene；GA：格尔德霉素 Geldanamycin. GA 预处理 Kc 细胞 5 h，JHA 处理 30 min 后提取 Kc 细胞核蛋白进行 EMSA 实验。Kc cells were pretreated with GA for 5 h and subsequently treated with JHA for 30 min, and then the nuclear proteins were extracted and subjected to EMSA analysis. None：未加任何蛋白 No protein was added.

JHRE 的鉴定而逐渐被解析。基于埃及伊蚊、家蚕、赤拟谷盗、果蝇以及蝗虫等昆虫中的研究，JH 调控昆虫生长发育的模型被认为是：当 JH 滴度较低或不存在时，JH 受体 Met 在细胞内以同源二聚体或与其同源类似物 Gce 结合形成异源二聚体的形式存在(Godlewski *et al.*, 2006)；而当 JH 滴度较高时，JH 与 Met 结合使得 Met-Met 或 Met-Gce 二聚体解离，并促使 Met 与其他共激活因子的结合，如 Taiman/FISC/SRC 或 CYC 等；最后 JH-Met 及其他共激活因子通过结合于 JH 下游靶基因调控区域的 JHRE 而促进靶基因的转录表达，最终通过靶基因的功能来实现 JH 的生理作用(Li *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2014; Saha *et al.*, 2016)。

不同于其他昆虫中仅包含 1 个类 E-box 序列的 JHRE，我们在果蝇中鉴定获得的 JHRR 含有 3 个类 E-box 序列，即 2 个 B box 和 1 个 C box。双荧光素酶报告检测系统结果表明 JHRR 的高转录活性依赖于这 3 个类 E-box 序列(He *et al.*, 2014)。本研究利用 EMSA 实验进一步阐明 B box 和 C box 对维持 JHRR 与核蛋白的有效结合是必需的(图 1)。以 2

个 B box 作为探针进行 EMSA 实验,发现 Met 超表达后可增强核蛋白与 B box 的结合,但当 JH 存在时,该结合受到抑制(未发表数据);而单独以 C box 作为探针,无论 JH 是否存在,均未能或仅检测到微弱的结合条带(未发表数据)。我们推测 2 个 B box 可能是 Met-Met 二聚体与 JHRR 的结合位点,而 C box 则是 Met 及其共激活因子发挥功能的区域。当 JH 不存在时,Met 同源二聚体结合在 B box 上;一旦 JH 结合上 Met,Met 二聚体解离,Met 与其他共激活因子共同结合于 C box 位点。B box 的作用主要是协助 Met 快速与 C box 结合而响应 JH 的应答。当 B box 失活或缺失时,Met 与 JHRR 的结合能力下降,从而导致 JHRR 的转录活性降低;而当 C box 突变时,JHRR 的转录活性几乎丧失(He *et al*., 2014)。然而,究竟 B box 和 C box 在 JHRR 转录活性的发挥中具体起着怎样的作用还有待深入研究。

热激蛋白 Hsp83 是细胞内高度保守的一类应激蛋白,在所有的真核生物中均有表达。其主要作用是作为分子伴侣帮助新合成的蛋白分子正确折叠及成熟稳定(Zhao and Houry, 2005)。哺乳动物中的研究表明,Hsp83 的同源类似物 Hsp90 与类固醇激素受体或二噁英受体结合对维持受体与配体的高亲和能力是必需的(Pongratz *et al*., 1992; Picard, 2006)。除此之外,果蝇中研究发现 Hsp90 及其共伴侣分子调控蜕皮激素受体复合物 EcR/USP 的 DNA 结合活性(Arbeitman and Hogness, 2000)。本实验及前期研究结果发现 Hsp83 失活或突变时,不仅降低了 Met 与 JH 的结合(He *et al*., 2014),同时 Met 与 JHRR 的 DNA 结合能力也随之降低(图 2: B,图 3),表明 Hsp83/Hsp90 对激素受体的调控机制是相对保守的。

综上所述,本实验通过 EMSA 技术证明我们前期鉴定获得的 JHRR 中的 B box 和 C box 对维持其转录表达活性都是必需的。利用 *Met/Gce* 双缺失果蝇及 *Met* 超表达果蝇进一步确定 Met 直接结合于 JHRR,并且该结合是受热激蛋白 Hsp83 的调控。该研究为下一步利用 JHRR 研究 Met 的转录活性调控及 JH 的信号传递提供基础。

参考文献(References)

Abdou MA, He QY, Wen D, Zyaan O, Wang J, Xu JJ, Baumann AA, Joseph J, Wilson, TG, Li S, Wang J, 2011. *Drosophila* Met and Gce are partially redundant in transducing juvenile hormone action. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 41(12): 938-945.

Arbeitman MN, Hogness DS, 2000. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell*, 101(1): 67-77.

Ashok M, Turner C, Wilson TG, 1998. Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(6): 2761-2766.

Baumann A, Fujiwara Y, Wilson TG, 2010. Evolutionary divergence of the paralogs *Methoprene tolerant* (*Met*) and *germ cell expressed* (*gce*) within the genus *Drosophila*. *J. Insect Physiol*., 56(10): 1445-1455.

Bernardo TJ, Dubrovsky EB, 2012. Molecular mechanisms of transcription activation by juvenile hormone: a critical role for bHLH-PAS and nuclear receptor proteins. *Insects*, 3: 324-338.

Bilen J, Atallah J, Azanchi R, Levine JD, Riddiford LM, 2013. Regulation of onset of female mating and sex pheromone production by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(45): 18321-18326.

Charles JP, Iwema T, Epa VC, Takaki K, Rynes J, Jindra M, 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(52): 21128-21133.

Dang CV, Dolde C, Gillison ML, Kato GJ, 1992. Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(2): 599-602.

Godlewski J, Wang S, Wilson TG, 2006. Interaction of bHLH-PAS proteins involved in juvenile hormone reception in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 342(4): 1305-1311.

Guo W, Wu ZX, Song JS, Jiang F, Wang ZM, Deng S, Walker VK, Zhou ST, 2014. Juvenile hormone-receptor complex acts on *mcm4* and *mcm7* to promote polyploidy and vitellogenesis in the migratory locust. *PLoS Genet*., 10(10): e1004702.

He QY, Wen D, Jia QQ, Cui CL, Wang J, Palli SR, Li S, 2014. Heat shock protein 83 (Hsp83) facilitates methoprene-tolerant (Met) nuclear import to modulate juvenile hormone signaling. *J. Biol. Chem*., 289(40): 27874-27885.

Jindra M, Palli SR, Riddiford LM, 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol*., 58: 181-204.

Jindra M, Uhlirova M, Charles JP, Smykal V, Hill RJ, 2015. Genetic evidence for function of the bHLH-PAS protein Gce/Met as a juvenile hormone receptor. *PLoS Genet*., 11(7): e1005394.

Kayukawa T, Minakuchi C, Namiki T, Togawa T, Yoshiyama M, Kamimura M, Mita K, Imanishi S, Kiuchi M, Ishikawa Y, Shinoda T, 2012. Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of *Kruppel homolog* 1, a repressor of insect metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(29): 11729-11734.

Kayukawa T, Tateishi K, Shinoda T, 2013. Establishment of a versatile cell line for juvenile hormone signaling analysis in *Tribolium castaneum*. *Sci. Rep*., 3: 1570.

Konopova B, Jindra M, 2007. Juvenile hormone resistance gene

Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(25): 10488 – 10493.

Li M, Mead EA, Zhu JS, 2011. Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(2): 638 – 643.

Miura K, Oda M, Makita S, Chinzei Y, 2005. Characterization of the *Drosophila Methoprene*-tolerant gene product. Juvenile hormone binding and ligand-dependent gene regulation. *FEBS J.*, 272(5): 1169 – 1178.

Picard D, 2006. Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.*, 17(6): 229 – 235.

Pongratz I, Mason GG, Poellinger L, 1992. Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J. Biol. Chem.*, 267(19): 13728 – 13734.

Saha TT, Shin SW, Dou W, Roy S, Zhao B, Hou Y, Wang XL, Zou Z, Girke T, Raikhel AS, 2016. Hairy and Groucho mediate the action of juvenile hormone receptor Methoprene-tolerant in gene repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113(6): E735 – E743.

Shin SW, Zou Z, Saha TT, Raikhel AS, 2012. bHLH-PAS heterodimer of methoprene-tolerant and Cycle mediates circadian expression of juvenile hormone-induced mosquito genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(41): 16576 – 16581.

Wilson TG, Fabian J, 1986. A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone. *Dev. Biol.*, 118(1): 190 – 201.

Zhang ZL, Xu JJ, Sheng ZT, Sui YP, Palli SR, 2011. Steroid receptor co-activator is required for juvenile hormone signal transduction through a bHLH-PAS transcription factor, methoprene tolerant. *J. Biol. Chem.*, 286(10): 8437 – 8447.

Zhao RM, Houry WA, 2005. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem. Cell Biol.*, 83(6): 703 – 710.

Zou Z, Saha TT, Roy S, Shin SW, Backman TW, Girke T, White KP, Raikhel AS, 2013. Juvenile hormone and its receptor, methoprene-tolerant, control the dynamics of mosquito gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(24): E2173 – E2181.

（责任编辑：马丽萍）